

Identifikasi *Edwardsiella tarda* secara morfologis, fisiologis dan biokimia



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Peralatan	3
4 Bahan	3
5 Prosedur	4
6 Pembacaan hasil	7
Lampiran A (normatif) Pembuatan media.....	9
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi	12
Bibliografi	14
Tabel 1 - Karakteristik <i>E. tarda</i>	8



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang identifikasi *Edwardsiella tarda* secara morfologis, fisiologis dan biokimia.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat – rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan :

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Identifikasi *Edwardsiella tarda* secara morfologis, fisiologis dan biokimia

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan Identifikasi bakteri *Edwardsiella tarda* secara morfologis, fisiologis dan biokimia.

2 Istilah dan definisi

2.1

contoh ikan

sejumlah kecil dari suatu populasi ikan yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistik

2.2

Edwardsiella Ichtaluri Media (EIM)

digunakan untuk meningkatkan selektifitas isolasi terhadap *E. tarda*

2.3

Edwardsiella tarda

bakteri tergolong dalam *enterobacter* bersifat Gram negatif

2.4

Gram negatif

hasil pewarnaan *Gram* yang ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah

2.5

ikan besar

Ikan yang sudah dapat dibedakan organ dalamnya secara makroskopis

2.6

ikan kecil

Ikan yang tidak dapat dibedakan organ dalamnya secara makroskopis

2.7

inkubasi

pengkondisian bakteri untuk tumbuh dan berkembangbiak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.8

inokulasi

menumbuhkan bakteri dari satu media ke media lain

2.9

isolasi

pemisahan bakteri dari organ target dari ikan dengan menumbuhkan pada media agar

2.10

isolat murni

bakteri hasil pemurnian dari koloni yang terisolasi

SNI 7663:2011

2.11

media

tempat menumbuhkan bakteri, biasanya berbahan dasar mengandung agar

2.12

media arginine

media yang digunakan untuk uji *arginine dihydrolase*

2.13

media *Lysine Iron Agar* (LIA)

media yang digunakan untuk menguji Lysin

2.14

media *Motility Indol Ornithin* (MIO)

media yang digunakan untuk menguji ornithin dan uji indol

2.15

media MR-VP

media yang digunakan untuk uji *methyl red* dan *voges proskauer*

2.16

media *nutrien gelatin*

media yang digunakan untuk uji *gelatin hydrolisis*

2.17

media selektif

media khusus untuk menumbuhkan bakteri tertentu

2.18

media *Simmons citrate*

media yang digunakan untuk uji sitrat

2.19

media *Sulfat Indol Motility* (SIM)

media yang digunakan untuk uji indol

2.20

media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

media yang digunakan untuk menguji H₂S

2.21

media *urease*

media yang digunakan untuk uji *urease*

2.22

media umum

media yang digunakan untuk penumbuhan bakteri

2.23

ONPG-peptone water broth

media yang digunakan untuk uji *β-galactosidase*

2.24**organ target**

bagian tubuh yang menjadi sasaran infeksi patogen dan digunakan sebagai objek pemeriksaan

2.25**pewarnaan Gram**

uji untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan sifat dinding sel bakteri dengan menggunakan pewarna *Gram*

2.26**uji oksidase**

suatu proses pengujian untuk melihat kemampuan bakteri memproduksi enzim oksidase

3 Peralatan

- a) alat tulis;
- b) *autoclave*;
- c) botol semprot;
- d) *bunsen burner*;
- e) *hot plate stirrer*;
- f) inkubator;
- g) jarum *Öse*;
- h) *laminarflow-hood (safety cabinet)*;
- i) *magnetic stirrer*;
- j) meja bedah;
- k) mikroskop;
- l) *mini mixer*;
- m) oven;
- n) peralatan bedah;
- o) peralatan gelas;
- p) pensil kaca;
- q) pipet tetes;
- r) pipet berskala;
- s) rak tabung reaksi;
- t) *refrigerator*;
- u) timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g.

4 Bahan

- a) akuades;
- b) alkohol 70 %;
- c) alkohol *acetone*;
- d) aluminium *foil*;
- e) *blood agar*;
- f) *Edwardsiella Ichtaluri Media (EIM)*;
- g) *filter paper*;
- h) kertas label;
- i) larutan *crystal violet*;
- j) larutan potasium iodida;
- k) larutan safranin;
- l) larutan H₂O₂ 3%/Bactident Oksidase;
- m) larutan glukosa disterilkan secara filterisasi;

- n) larutan laktosa disterilkan secara filterisasi;
- o) larutan inositol disterilkan dengan *autoclave*;
- p) *Lysine Iron Agar* (LIA);
- q) media umum (*Tryptone Soy Agar* /TSA; *Tryptone Soy Broth* / TSB, *Brain Heart Infusion Agar*/BHIA, *Nutrient Agar*/NA);
- r) MIO agar;
- s) *paraffin*;
- t) *paraffin oil* steril;
- u) SIM agar;
- v) *Simmons citrate agar*;
- w) *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA).

CATATAN Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran A dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran B.

5 Prosedur

5.1 Preparasi contoh

5.1.1 Ikan besar

- a) Bersihkan permukaan tubuh ikan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70 %.
- b) Bedah ikan menggunakan peralatan bedah steril, ambil organ target (hati, ginjal, limpa), dan sterilkan permukaannya dengan alkohol 70 %, kemudian siap dilakukan isolasi. Isolasi dapat juga dilakukan dari permukaan tubuh yang luka, atau sediaan darah.

5.1.2 Ikan kecil dan telur

Ambil contoh, dibilas dengan menggunakan akuades steril minimal 3 kali, kemudian ikan/telur digerus secara steril, contoh siap untuk diisolasi.

5.2 Isolasi bakteri

- a) Bersihkan permukaan meja kerja dengan alkohol 70 %.
- b) Tusuk organ target dan hasil gerusan dengan jarum *Öse* steril secara aseptis kemudian goreskan ke media umum TSA/BHIA.
- c) Inkubasikan pada suhu 26 °C selama 24 jam - 48 jam.
- d) Lakukan pre-isolasi untuk meningkatkan keberhasilan isolasi pada media *thyoglycolate*, dan setelah tumbuh baru dipindah pada TSA/BHIA.

5.3 Pemurnian koloni

- a) Ambil koloni tunggal berwarna putih berukuran 1 mm yang tumbuh goresan yang diduga *E. tarda* untuk selanjutnya dimurnikan.
- b) Apabila hasil pemurniannya diperoleh koloni yang seragam maka diteruskan dengan uji identifikasi.

5.4 Tahap pengujian

5.4.1 Uji pewarnaan *Gram*

- a) Bersihkan gelas benda menggunakan alkohol kemudian panggang di atas *bunsen burner* hingga kering.

- b) Inokulasikan bakteri sebanyak 1 \bar{O} se di atas gelas benda, kemudian ratakan dan fiksasi di atas *bunsen burner*.
- c) Mulai pewarnaan dengan penggenangan larutan (*Gram A*) selama 1 menit kemudian bilas menggunakan akuades.
- d) Teteskan larutan *Gram B* dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas menggunakan akuades.
- e) Berikan larutan peluntur (*Gram C*) selama 30 detik kemudian cuci menggunakan akuades.
- f) Genangkan pewarna penutup (*Gram D*) selama 2 menit kemudian cuci menggunakan akuades dan kering-anginkan.
- g) Amati morfologi sel bakteri dan sifat *Gram* menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.
- h) Sifat bakteri *Gram* negatif ditandai dengan sel bakteri berwarna merah/*pink*, bentuk batang pendek.

5.4.2 Uji *motility*

5.4.4.1 Cara langsung :

- a) Siapkan *objek glass* steril, genangi dengan akuades steril.
- b) Teteskan kultur bakteri kedalam genangan akuades tersebut, kemudian ratakan dan tutup dengan *cover glass*.
- c) Amati menggunakan mikroskop menggunakan perbesaran 400 kali.
- d) Bakteri dikatakan motil apabila menunjukkan gerakan yang aktif.

5.4.4.2 Cara tidak langsung :

- a) Kultur bakteri pada medium TSB kemudian diambil menggunakan jarum lurus.
- b) Tusukkan jarum pada medium *motility* (SIM atau MIO) (bersifat setengah padat).
- c) Inkubasi medium selama 24 jam atau lebih.
- d) Bakteri bersifat motil ditandai apabila pertumbuhan koloni bakteri menyebar tidak hanya pada daerah tusukan.

5.4.4.3 Uji β galaktosidase

- a) Bakteri diinokulasikan ke ONPG-*peptone water broth* dengan \bar{O} se bulat.
- b) Inkubasi pada 37 °C selama 20 menit sampai 24 jam.
- c) Bakteri dikatakan tidak memiliki enzim β galaktosidase jika tidak ada perubahan warna media.

5.4.4.4 Uji Arginin dihydrolase

- a) Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan \bar{O} se bulat.
- b) Bakteri diinokulasikan ke media arginine kemudian media ditutup parafin cair dengan ketebalan 1 cm.
- c) Inkubasi bakteri dilakukan 24 jam atau lebih sehingga reaksi yang terjadi dapat dibaca dengan jelas.
- d) Bakteri dikatakan tidak memiliki enzim *arginin dehydrolase* ditandai dengan warna medium menjadi makin pudar.

5.4.4.5 Uji Lysin decarboxylase

- a) Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan \bar{O} se bulat.
- b) Bakteri diinokulasikan ke media Lysine Iron Agar dengan cara membuat goresan pada bagian miring dan tusukan yang tidak tembus pada bagian tegak.

- c) Inkubasi bakteri dilakukan 24 jam atau lebih sehingga reaksi yang terjadi dapat dibaca dengan jelas.
- d) Bakteri dikatakan memiliki enzim *lysine dekarboksilase* ditandai warna medium yang tetap ungu.

5.4.4.6 Uji *Ornithin decarboxylase*

- a) Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan ∞ se bulat.
- b) Bakteri diinokulasikan ke media MIO (*Motil Indol Ornithin*).
- c) Inkubasi bakteri dilakukan 24 jam atau lebih sehingga reaksi yang terjadi dapat dibaca dengan jelas.
- d) Bakteri dikatakan memiliki enzim *ornithin decarboxylase* ditandai perubahan warna medium menjadi putih/kuning.

5.4.4.7 Uji *Simmons' citrat*

- a) Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan ∞ se bulat.
- b) Bakteri diinokulasi pada medium *Simmon citrate*.
- c) Bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam. Apabila medium tetap hijau maka bakteri tidak mampu memanfaatkan sitrat.

5.4.4.8 Uji produksi H_2S pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

- a) Inokulasi bakteri pada medium TSIA dengan cara ditusuk dan *streak*, kemudian inkubasi selama 24 jam.
- b) Amati sifat bakteri berdasarkan perubahan warna medium pada daerah miring (*aerob*) dan daerah tusukan (*anaerob*).
- c) Pengamatan produksi gas dapat diketahui berdasarkan terbentuknya rongga udara pada daerah *anaerob*. Produksi H_2S ditandai dengan munculnya pigmen kehitaman pada media, dimana pada umumnya akan muncul setelah dilakukan perpanjangan masa inkubasi 48 jam atau lebih.

5.4.4.9 Uji *Urease*

- a) Ambil inokulum bakteri dengan jarum ∞ se steril. Inokulasikan ke dalam media *urease broth*.
- b) Inkubasikan selama 24 jam - 48 jam pada suhu ruang.
- c) Dengan cara melihat perubahan warna uji negatif (-) jika media tidak berwarna.

5.4.4.10 Uji indol

- a) Inokulasi bakteri pada medium MIO atau SIM kemudian diinkubasi.
- b) Teteskan pereaksi Kovacks/*Erlich* kedalam medium MIO sebanyak 1 tetes - 3 tetes.
- c) Reaksi indol positif ditandai terbentuknya cincin merah pada pereaksi Kovacks/ *Erlich*.

5.4.4.11 Uji *Methyl Red (MR test)*, *Voges Proskauer Test (MR-VP Test)*

- a) Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan ∞ se bulat.
- b) Bakteri diinokulasikan pada 2 tabung medium MR - VP kemudian diinkubasi.
- c) Satu tabung ditetesi reagen *Methyl Red* sebanyak 5 tetes. Jika permukaan berwarna merah (indikator $pH < 4,4$) maka bakteri mampu menghasilkan asam sebagai produk akhir fermentasi glukosa.
- d) Satu tabung tersisa ditetesi dengan reagen *Barrit's*. Kocok, miringkan. Jika berwarna pink berarti VP +, dimana bakteri tersebut mampu memproduksi produk yang bersifat tidak asam atau netral dari asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa.

5.4.4.12 Uji Gelatin hidrolisis

- Bakteri diambil dari biakan agar tegak umur 24 jam dengan ϕ se bulat.
- Bakteri diinokulasikan pada medium nutrisi gelatin dan diinkubasi pada suhu yang sesuai.
- Setelah dilakukan inkubasi, medium diletakkan pada refrigerator selama 15 menit kemudian diamati perubahan yang terjadi.
- Apabila medium menjadi padat maka bakteri tidak mampu menghidrolisis gelatin.

5.4.4.13 Uji fermentasi karbohidrat (arabinose, glukose, inositol, mannitol, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose)

- Inokulasi bakteri pada medium karbohidrat yang dilengkapi dengan tabung *Durham* dan indikator *phenolred broth base*, kemudian diinkubasi.
- Reaksi glukose positif ditandai terjadinya perubahan warna media dari merah menjadi kuning dan pada tabung *Durham* terlihat gelembung udara (menghasilkan gas).
- Reaksi arabinose negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi inositol negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi mannitol negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi rhamnose negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi sorbitol negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi sucrose negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.
- Reaksi trehalose negatif ditandai warna media tetap merah atau berubah menjadi merah jambu.

5.4.4.14 Uji *Edwardsiella Ichtaluri Media* (EIM)

- Bakteri diinokulasikan pada media selektif *Edwardsiella Ichtaluri Media* (EIM) dengan cara *streak*, kemudian diinkubasi.
- Pada media ini *E. tarda* akan menghasilkan koloni berwarna hijau dengan pusat berwarna hitam.

6 Pembacaan hasil

Bakteri dinyatakan sebagai *E. tarda* apabila memenuhi kriteria sesuai Tabel 1.

Tabel 1 - Karakteristik *E. tarda*

No	Test	Hasil reaksi
1.	Uji <i>Gram</i>	<i>Gram</i> negatif, bentuk batang pendek
2.	Uji motilitas	motil
3.	Uji oksidase	Negatif
4.	Uji β -galaktosida	Negatif
5.	Uji <i>Arginin dihydrolase</i>	Negatif
6.	Uji <i>Lysin decarboksilase</i>	Positif
7.	Uji <i>Ornithin decarboksilase</i>	Positif
8.	Uji <i>Simmon sitrat</i>	Negatif
9.	Uji produksi H ₂ S pada media TSIA	Positif H ₂ S
10.	Uji <i>Urease</i>	Negatif
11.	Uji <i>Tryptophane deaminase</i>	Negatif
12.	Uji indol	Positif indol
13.	Uji <i>Methyl red</i>	Positif
14.	Uji <i>Voges-Prokauer</i>	Negatif
15.	Uji Gelatin hidrolisis	Negatif
16.	Uji Gas dari glukosa	Positif
17.	Uji asam dari : Arabinose	Negatif
	Glukosa	Positif
	Inositol	Negatif
	Mannitol	Negatif
	Rhamnose	Negatif
	Sorbitol	Negatif
	Sucrosa	Negatif
	Trehalosa	Negatif
18.	Uji EIM	Positif

Lampiran A (normatif) Pembuatan media

A.1 Media *Tryptone Soy Agar* (TSA)

Cara membuat:

- a) Timbang TSA sebanyak 40 gram.
- b) Tambahkan ke dalam 1000 ml akuades dalam erlenmeyer yang diberi *magnetic stirrer*.
- c) Panaskan di atas *hot plate* hingga mendidih.
- d) Steril dengan *autoclave* 121 °C, 15 atm selama 15 menit.
- e) Bagi ke dalam cawan petri atau tabung reaksi yang sudah steril.
- f) Simpan dalam *laminary* dengan suhu ruang (27 °C) selama 24 jam lalu masukkan ke *refrigerator*.

A.2 Media *Tryptone Soy Broth* (TSB)

Cara membuat:

- a) Timbang TSB sebanyak 30 gram.
- b) Tambahkan ke dalam 1000 ml akuades dalam erlenmeyer yang diberi *magnetic stirrer*.
- c) Panaskan di atas *hot plate*, tidak sampai mendidih.
- d) Steril dengan *autoclave* 121 °C selama 15 menit.
- e) Bagi ke dalam tabung reaksi yang sudah steril.
- f) Simpan dalam *laminary* dengan suhu ruang (27 °C) selama 24 jam lalu masukkan ke *refrigerator*.

A.3 Media *Motility Indol Ornithine* (MIO)

Cara membuat:

- a) Timbang MIO sebanyak 31 gram.
- b) Tambahkan ke dalam 1000 ml akuades dalam erlenmeyer yang diberi *magnetic stirrer*.
- c) Panaskan di atas *hot plate* hingga mendidih.
- d) Steril dengan *autoclave* 121 °C selama 15 menit.
- e) Bagi ke dalam tabung reaksi yang sudah steril.
- f) Simpan dalam *laminary* dengan suhu ruang (27 °C) selama 24 jam lalu masukkan ke *refrigerator*.

A.4 Media *Simmons citrate*

Bahan:

- | | |
|--------------------------|-----------|
| – <i>simmons citrate</i> | 22,5 gram |
| – akuades | 1000 ml |

Cara membuat:

- a) Larutkan *Simmons citrate* dalam akuades tanpa pemanasan.
- b) Sterilisasi dengan *autoclave* suhu 121 °C, 15 atm selama 15 menit.
- c) Distribusikan ke dalam tabung reaksi
- d) Dinginkan dengan posisi miring.

A.5 Media Sulphide-Indole-Mortality (SIM)

Bahan:

- SIM 30 gram
- akuades 1000 ml

Cara membuat:

- a) Larutkan SIM dalam akuades dengan pemanasan hingga mendidih (larut sempurna).
- b) Kemudian sterilisasi dengan *autoclave* suhu 121 °C, 15 atm selama 15 menit.
- c) Distribusikan ke dalam tabung reaksi.

A.6 Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Cara membuat:

- a) Timbang TSIA sebanyak 65 gram.
- b) Tambahkan ke dalam 1000 ml akuades dalam erlenmeyer yang diberi *magnetic stirrer*.
- c) Panaskan di atas *hot plate* hingga mendidih.
- d) Steril dengan *autoclave* 121 °C, 15 atm selama 15 menit.
- e) Bagi ke dalam tabung reaksi yang sudah steril.
- f) Atur dalam posisi miring (*slant position*).
- g) Simpan dalam *laminary* dengan suhu ruang (27 °C) selama 24 jam masukan ke *refrigerator*.

A.7 Media glukosa

Cara membuat:

- a) Campur 10 gram *bactopepton* dengan 5 gram NaCl, larutkan dalam 1000 ml akuades dengan pemanasan (larut sempurna).
- b) Setelah mendidih tambahkan 0,018 *phenol red*.
- c) Dinginkan hingga suhu larutan 50 °C kemudian tambahkan 1 gram glukosa.
- d) Distribusikan ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung *durham* kemudian sterilisasi dengan *autoclave* suhu 121 °C, 15 atm selama 15 menit.

A.8 ONPG-peptone water broth

- a) Larutan ONPG

Bahan:

- ONPG 6 gram
- *Sodium phosphate* buffer, pH 7,5 0,01 M 1000 ml

Persiapan:

- Larutkan pada suhu kamar (25 °C)
- Sterilisasi: filtrasi
 1. Metode milipore membrane filter.
 2. Membran dengan diameter pori 0,45 µ.

- b) *Peptone water*, 1 %

Bahan:

- *Peptone* 10 gram
- *Sodium chloride* 5 gram
- *Distilled water* 1000 ml

Persiapan:

- Tuang bahan pada botol *flask* dan larutkan dengan pemanasan.
- Atur pH dari 8,0 sampai 8,4.
- Didihkan selama 10 menit kemudian saring.
- Atur kembali pH dari 7,2 sampai 7,4.
- *Autoclave* 115 °C selama 20 menit.

c) ONPG *Broth*

Cara membuat :

- a) Secara aseptik tambahkan 1 (satu) bagian larutan ONPG steril (250 ml) ke 3 (tiga) bagian 1 % *peptone water* steril (750 ml) dalam botol *flask* steril. Untuk mengurangi penggunaan tambahan botol *flask* steril, tambahkan 250 ml larutan ONPG (1 bagian) yang telah disiapkan langsung ke 750 ml *peptone water* (3 bagian).
- b) *Tube* berisi kurang lebih 2,5 ml ONPG *broth per tube* steril. Medium pada *tube* dapat stabil selama 1 bulan dalam refrigerator (4 °C).



Lampiran B
(normatif)
Pembuatan pereaksi

B.1 Pewarnaan Gram**B.1.1 Gram A**

Bahan:

– kristal violet	2	gram
– alkohol (95 %)	20	ml
– <i>amonium oksalat</i>	0,8	gram
– akuades	80	ml

Cara membuat:

- a) Campur kristal violet dengan alkohol hingga homogen.
- b) Larutkan *amonium oksalat* dalam akuades.
- c) Campur kedua larutan kemudian diamkan selama 24 jam dan disaring.

B.1.2 Gram B

Bahan:

– <i>potasium iodida</i> (KI)	2	gram
– akuades	300	ml
– iodine	1	gram

Cara membuat:

- a) Larutkan KI dalam 20 ml akuades. Tambahkan iodine.
- b) Setelah larut, tambahkan akuades 280 ml ke dalam larutan.

B.1.3 Gram C

Bahan:

– alkohol absolut	95	ml
– <i>acetone</i>	5	ml

Cara membuat:

Larutkan kedua bahan hingga homogen.

B.1.4 Gram D

Bahan:

– safranin	0,25	gram
– alkohol 95 %	10	ml
– akuades	90	ml

Cara membuat:

- a) Larutkan safranin dalam alkohol.
- b) kemudian tambahkan akuades dan larutkan sampai homogen.

B.2 H₂O₂, 3 %

Bahan:

- | | |
|---------------------------------|-------|
| – H ₂ O ₂ | 3 ml |
| – akuades | 97 ml |

Cara membuat:

Larutkan H₂O₂ dalam akuades dan homogenkan.



Bibliografi

Barrow G.I and Feltham R.K.A., 2003. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press.

Frerich G.N. And Milliar S.D., 1993. *Manual for The isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.

Mac Faddin J.F, 1983. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Second Edition. William & Wilkins Baltimore. London

Pusat Karantina Ikan, 2008. *Metode Standar Pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri*. 52 pp







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id